

Cellvento® ModiFeed Prime COMP による フィード戦略の最適化：スケーラブルなプロセス

複雑さを抑えて生産性を最大化する上流プロセスの開発は、培地とフィードの適切な組み合わせ及び培養条件の厳密な管理を維持する能力に依存します。フェドバッチモードでは最初に比較的栄養の少ない培地で細胞を増殖させてから、定期的なフィード添加を行って要求される目的物質の収量を得ます。

Cellvento® ModiFeed Prime COMP は、細胞機能に必要な枯渇した栄養を補充しフェドバッチモードでの生産培養期間を延長するための、高濃度で中性 pH でのシングルフィードを実現した Chemically Defined (CD) 培地です。あらゆるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞発現系によるモノクローナル抗体 (mAb) 及び次世代バイオ医薬品のフェドバッチ生産用に処方されており、Cellvento® 4CHO COMP と EX-CELL® Advanced CHO 生産培地又は多くの主要な CHO 細胞用基本培地と組み合わせで使用できます。

このフィードにより、作業工程の複雑さとプロセスリスクを低減できます。このフィードは圧縮乾燥粉末であり、その特長として、バルク容積が少なく、流動性に優れ、粉塵が少なく、取扱いが簡単で速く溶解します。溶解した後のフィードは遮光下に 2°C ~ 8°C で 90 日間又は室温で 30 日間保存できます。

Cellvento® ModiFeed Prime COMP の利点を表 1 にまとめました。

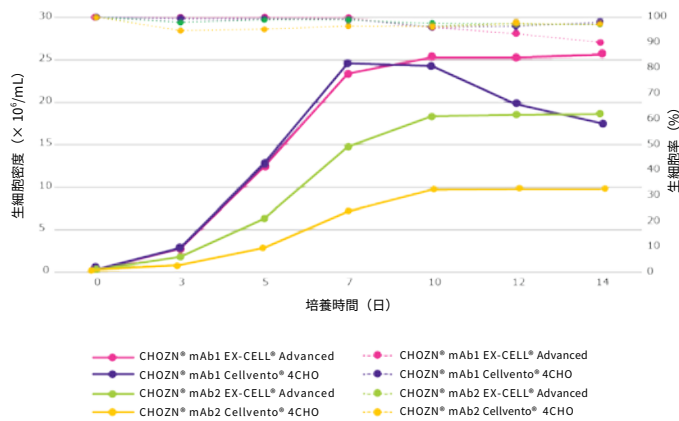
Cellvento® ModiFeed Prime COMP の特徴	利点
全成分が非動物由来 (NAO) であり、加水分解物、フェノールレッド、2-メルカプトエタノールを含まない	潜在的なウイルス混入リスクを低減し、バッチ間の均一性が向上
高濃度処方 (>131 g/L)	フィード量を抑制 (15% ~ 27.5%)、バイオリクターの運転容量を最大化、産生物の希釈を低減、収量を増大
グルコースを含まない処方	グルコースフィード戦略の完全な管理が可能
修飾アミノ酸及びアミノ酸誘導体を含むシングルフィードを実現	溶解、保存及びフィード添加の複雑さを低減し、追加の高 pH フィードが不要
pH 調整が必要なく最終 pH が中性	溶解に際して酸又は塩基を使用する必要がなく、フェドバッチプロセスに対する高 pH 又は低 pH の影響がない
圧縮乾燥粉末として提供	取り扱いが容易
溶解したフィードは遮光下に 2°C ~ 8°C で 90 日間又は室温で 30 日間まで保存可	保存方法・使用方法オプションが増え、室温保存する際のバイオリクターへの (無菌) 接続回数が増えられコンタミリスクが低減

表 1. フェドバッチプロセスでの Cellvento® ModiFeed Prime COMP の主な利点

パフォーマンスについて

Cellvento® ModiFeed Prime COMP により、CHOZN® プラットフォームを用いて作製された細胞株を含め、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-S 及び CHO-GS など広範な浮遊 CHO 細胞株で最適な細胞増殖と高い生産性が得られます。図 1 に示すとおり、このフィードはさまざまな基本培地での細胞増殖及び生産に使用できますが、特定の基本培地はパフォーマンス指数に影響する可能性があります。

CHOZN® mAb1 及び mAb2 の 2 種類の mAb 細胞株を、EX-CELL® Advanced CHO 又は Cellvento® 4CHO COMP フェドバッチ培地を入れたスピントチューブで培養しました。



Cellvento® ModiFeed Prime COMP を総量 17.5% で添加しました。CHOZN® mAb1 の生細胞密度 (VCD) は両方の培地で同様のピークを示しましたが、Cellvento® 4CHO COMP 培地では生存率が良好に維持され、生産性も最大となりました。CHOZN® mAb2 は EX-CELL® Advanced CHO フェドバッチ培地の方が VCD のピークが高く、これに伴い生産性も高くなりました。EX-CELL® Advanced CHO 及び Cellvento® 4CHO COMP フェドバッチ培地はいずれも良好なパフォーマンスを示しましたが、クローンによる嗜好が明確に示されました (図 1B)。

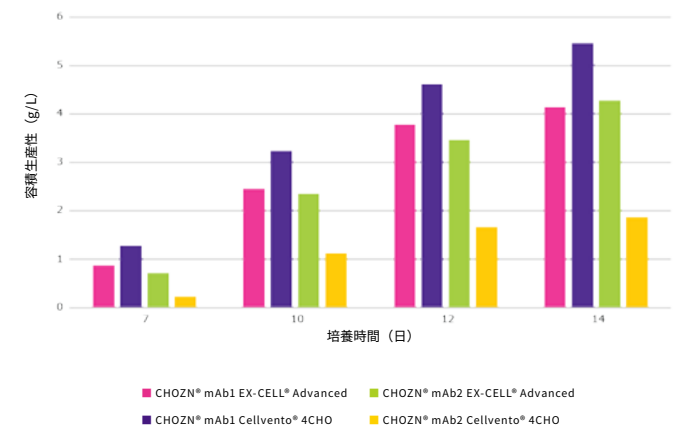


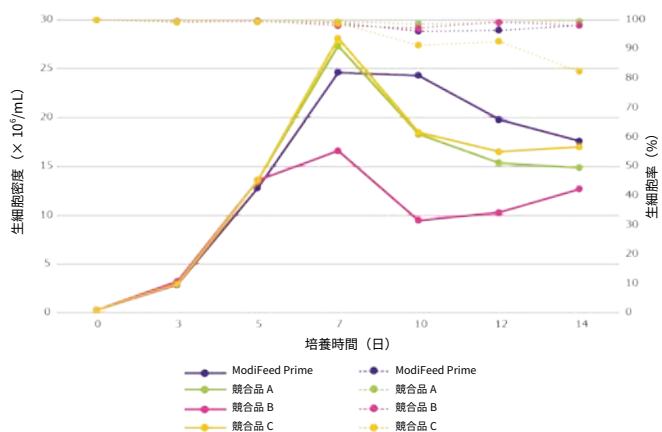
図 1. 各種培地での Cellvento® ModiFeed Prime COMP のパフォーマンス。EX-CELL® Advanced CHO fed-batch medium 及び Cellvento® 4CHO COMP で CHOZN® mAb1 及び mAb2 を 14 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (1A 実線)、生細胞率 (1A 破線) 及び容積生産性 (1B)。

Cellvento® 4CHO COMP は CHOZN® mAb1 に最良の培地でした (図 1B)。Cellvento® ModiFeed Prime COMP は Cellvento® 4CHO COMP と組み合わせるフィードとして最適です。図 2 に、Cellvento® 4CHO COMP を入れたスピントチューブで CHOZN® mAb1 を培養したときの Cellvento® ModiFeed Prime COMP とその他の市販フィード製品のパフォーマンスを比較します。

Cellvento® ModiFeed Prime COMP を総フィード量 17.5% で添加し、その他のフィードは各製品の文献に記載されている

主な推奨に従って添加しました。Cellvento® ModiFeed Prime COMP は生細胞密度のピークが最高ではなかったものの、競合品 A 及び C と比べて長時間にわたり生細胞密度が高く維持されました (図 2A)。Cellvento® ModiFeed Prime COMP は分析を行ったすべての日に容積生産量が最高でした。(図 2B)。競合品 B は生細胞密度のピークが最も低く、容積生産性が最低でした。

2A



2B

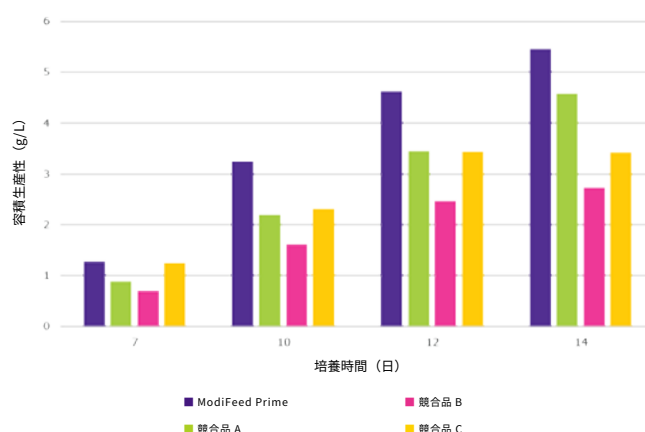


図 2. Cellvento® ModiFeed Prime COMP とその他の市販フィード製品のパフォーマンスの比較。Cellvento® ModiFeed Prime COMP 又はその他の市販フィード製品を添加して Cellvento® 4CHO COMP で CHOZN® mAb1 を 14 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (2A 実線)、生細胞率 (2A 破線) 及び容積生産性 (2B)。

Cellvento® ModiFeed Prime COMP フィード戦略

ほとんどの上流バイオプロセスと同様、パフォーマンスを最大にするために、フィード量及びフィード添加のタイミングをプロセスや細胞株ごとに最適化しなければなりません。Cellvento® 4CHO COMP 又は EX-CELL® Advanced CHO fed-batch medium と組み合わせて使用するとき、Cellvento® ModiFeed Prime COMP は、検討クローンの要求によって総フィード量 15% ~ 27.5% の間で添加することが推奨されます。表 2 に、フィード量 (%)、頻度及びグルコース濃度の推奨評価範囲を示します。

過剰なフィードを避けるため、生細胞密度が 2×10^6 cells/mL 以上になった場合のみ、かつ 3 日目以降にフィード添加を開始することをお奨めします。

生細胞率が 70% を下回ったところで培養を終了してハーベストします。対象クローンの一般的な要求が既知の場合を除き、最

初の評価では総フィード量 17.5% 及び 22.5% を検討することをお奨めします (表 3A)。総フィード量 (%) が低めか高めかが判明すれば、総フィード量をさらに増減して最適化します。必要に応じてスケジュールを調節し、より定期的なフィード間隔にできます (表 3B)。

評価項目	推奨評価範囲
Cellvento® ModiFeed Prime COMP	2.5% - 7.5%(v/v)
頻度	48 ~ 72 時間の添加間隔
グルコース	4 ~ 6 g/L、毎日測定

表 2. フィード戦略最適化のガイドライン

3A

培養日	総フィード量	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	総フィード量
Cellvento® ModiFeed Prime COMP (% v/v)	低水準				3		3		5.5			3		3			17.5
Cellvento® ModiFeed Prime COMP (% v/v)	高水準				4		4		6.5			4		4			22.5

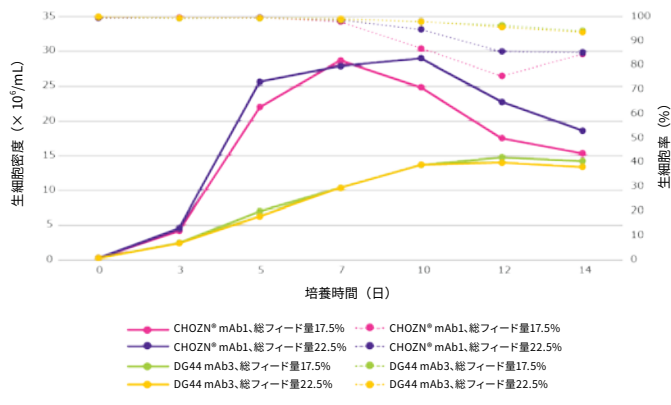
3B

培養日	総フィード量	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	総フィード量
Cellvento® ModiFeed Prime COMP (% v/v)	低水準				3.5		3.5		3.5			3.5		3.5			17.5
Cellvento® ModiFeed Prime COMP (% v/v)	高水準				4.5		4.5		4.5			4.5		4.5			22.5

表 3. フィード戦略最適化のための低及び高水準条件 (3A) 及びより定期的なフィード間隔オプション (3B)

提案する最初のフィード評価は、低い播種密度 ($2 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL) の 14 日間フェドバッチプロセス用にデザインされています。培養後期に依然として生細胞率が高い場合は、追加フィードでフェドバッチプロセスを延長することが可能で、生細胞率が 80% を下回るまで同じ頻度及び量 (%) でフィードを続けます。高い播種密度 ($2 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL) のフェドバッチでは、培養早期に高いバイオマスに達するようフィード添加スケジュールを調節し、総フィード量を多くすることも必要です。培養早期にバイオマスを高めるため、早ければ培養 2 日目からフィード添加を開始することができます。高い播種密度は長いフェドバッチ期間を短縮するが同じ 14 日間で生産性を高めるオプションとなります。

フィードを増やすと生産性が向上することもあれば、クローンによっては生産性に影響しないか悪影響を及ぼすこともあるため (図 3)、複数のフィード戦略を検討することが重要です。CHOZN® mAb1 及び DG44 mAb3 をそれぞれ Cellvento® 4CHO COMP 及び EX-CELL® Advanced CHO fed-batch media を用いてスピントューブで培養しました。



Cellvento® ModiFeed Prime COMP を総フィード量 17.5% (3 及び 5 日目に 3%、7 日目に 5.5%、10 及び 12 日目に 3%) 又は総フィード量 22.5% (3 及び 5 日目に 4%、7 日目に 6.5%、10 及び 12 日目に 4%) で添加しました。Cellvento® ModiFeed Prime COMP を用いて、ここに示した CHOZN® 及び DG44 の高パフォーマンス CHO 細胞株はいずれも最大の生産能に達しています。

フィード戦略にかかわらず、両クローンで VCD のピークは同様でした (図 3A)。CHOZN® mAb1 を総フィード量 22.5% で培養したとき高い生細胞率と VCD が維持され、容積生産性のピークが高くなりました。DG44 mAb3 の VCD 及び生細胞率には総フィード量が影響しませんでした。総フィード量の増加は、DG44 mAb3 よりも CHOZN® mAb1 の生産性に有意に大きな影響を及ぼしました (図 3B)。

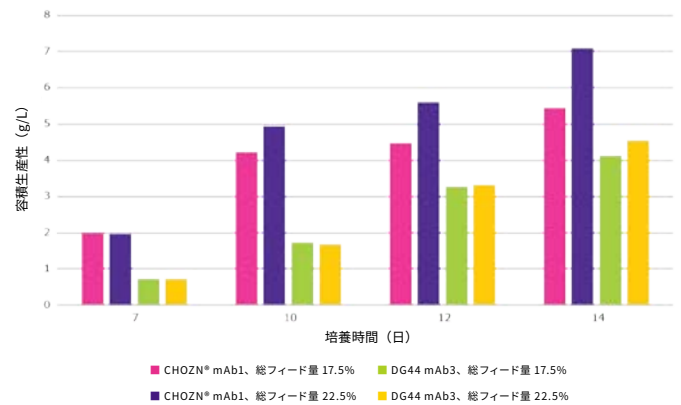


図 3. 異なる細胞株を用いた Cellvento® ModiFeed Prime COMP でのフィード添加スケジュールの影響。Cellvento® 4CHO COMP フェドバッチ培地で CHOZN® mAb1 を、もしくは EX-CELL® Advanced CHO fed-batch medium で DG44 mAb3 を 14 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (3A 実線)、生細胞率 (3A 破線) 及び容積生産性 (3B)。

スケーラビリティ

Cellvento® ModiFeed Prime COMP の使用はスケーラブルで、増殖、生細胞率、生産性、グリコシル化及びチャージバリエーションについて同等の結果が得られます (図 4)。CHOZN® mAb1 を EX-CELL® Advanced CHO fed-batch medium を入れたスピントューブ、3L Mobius® シングルユースバイオリアクター及び 50L Mobius® シングルユースバイオリアクターで培養しました (表 4)。Cellvento® ModiFeed Prime COMP を総フィード量 25% (3 及び 5 日目に 4.5%、7 日目に 7%、10 及び 12 日目に 4.5%) で添加しました。高い総フィード量がこのクローンに最適であることが判明し (図 3B)、フィード戦略の項に記載したとおり、さらに最適化を行いました (データ未掲載)。EX-CELL® Advanced CHO fed-batch medium を使用し、より高い総フィード量 (%) を用いたときに両培地で総フィード量

17.5% (図 1B) と比べて生産性が増加することを確認しました。CHOZN® mAb1 を 50L Mobius® シングルユースバイオリアクターで培養したとき、3L Mobius® シングルユースバイオリアクター又はスピントューブと比べて生細胞密度ピーク、生存率及び生産性がやや向上しました。

検討した 3 つのスケール間で糖鎖プロファイル (図 4C) にごくわずかな変化が認められました。

Mobius® シングルユースバイオリアクターを使用すると、スピントューブと比べて酸性バリエーションが増加し、メインのチャージバリエーションが減少しました (図 4D)。

実験条件	操作パラメータ	操作パラメータ	操作パラメータ
培養容器	スピントューブ	Mobius® 3L シングルユースバイオリアクター	Mobius® 50L シングルユースバイオリアクター
開始培養液量	30m L	1.4L	32.6L
播種密度	5×10^5 viable cells/mL	5×10^5 viable cells/mL	5×10^5 viable cells/mL
温度	37°C	36.8°C	36.8°C
攪拌	320 rpm (25 mm オービタル)	約 14 W/m ³ (200 rpm)	約 14 W/m ³ (150 rpm)
DO セットポイント	NA	50%	50%
DO 制御	NA	オープンパイプから O ₂	オープンパイプから O ₂
pH セットポイント/デッドバンド	NA	6.9 (+0.10/-0.15)	6.9 (+0.10/-0.15)
pH 制御	5% CO ₂	CO ₂ 及び Na ₂ CO ₃	CO ₂ 及び Na ₂ CO ₃
サンプル採取点	試験 0、3、5、7、10、11、12、14 日目	試験 0、3、4、5、6、7、10、11、12、13、14 日目	試験 0、3、4、5、6、7、10、12、13、14 日目
サンプル採取量	0.5 ~ 2 mL/ 日 (必要な分析による)	6 ~ 25 mL/ 日 (必要な分析による)	10 ~ 25 mL/ 日 (必要な分析による)
グルコース添加	サンプル採取日に 6 g/L 以上となるよう添加	サンプル採取日に 6 g/L 以上となるよう添加	サンプル採取日に 6 g/L 以上となるよう添加

表 4. 実験条件及び操作パラメータ：スピントューブ、3L 及び 50L バイオリアクター

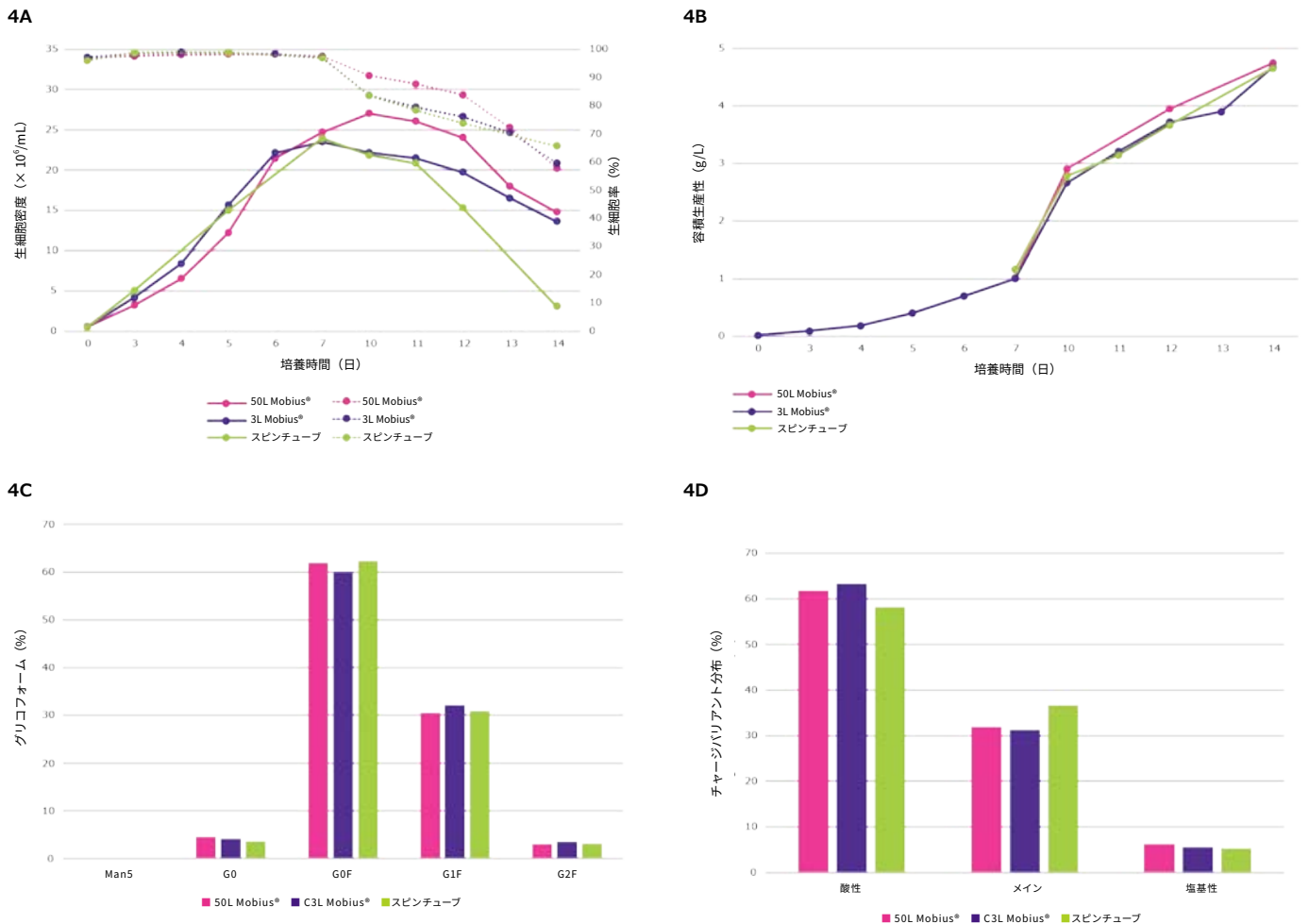


図 4. 異なるスケールでの ModiFeed Prime COMP のパフォーマンス：スピントューブ、3L 及び 50L バイオリアクター EX-CELL® Advanced CHO fed-batch medium で CHOZN® mAb1 を 14 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (4A 実線)、生細胞率 (4A 破線)、容積生産性 (4B)、14 日目の糖鎖プロファイル (4C) 及び 14 日目のチャージバリエーション分布 (4D)。スピントューブ、3L Mobius® シングルユースバイオリアクター及び 50L Mobius® シングルユースバイオリアクターで培養。

結論

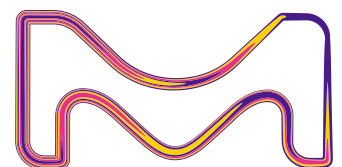
上流プロセスの開発では培地及びフィード処方を慎重に選択し組み合わせることで培養条件を最適化する必要があります。Cellvento® ModiFeed Prime COMP は、上流プロセスの開発において複雑さを抑え生産性を最大化するために不可欠な役割を果たします。このフィードは広範な浮遊 CHO 細胞株及び基本培地と組み合わせることができ、Cellvento® 4CHO COMP 培地及び EX-CELL® Advanced CHO fed-batch medium と組み合わせれば現行製品よりも高い生産性が見込めます。

確実なパフォーマンスに加え、圧縮乾燥粉末であるこのフィードは取扱いが容易でワークフローが合理化されます。中性 pH でのシングルフィードが可能な圧縮粉末製品であり、酸性又は塩基性フィードのように pH の影響を緩和する手間が不要です。溶解した後のフィードは遮光下に 2°C ~ 8°C で 90 日間又は室温で 30 日間安定であるため保存の柔軟性が高く、取扱い要件が少ないためコンタミリスクも軽減できます。

Facebookもチェック 

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ 



本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2022 年 3 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK_AN8700EN Ver 1.0

メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp

製品・技術に関するお問合せ : PStechservice_JP@merckgroup.com

注文に関するお問合せ : PScomericalservice_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143

PSM276-2203-PDF-MA